

10/540208

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 16 FEB 2004
WIPO
PCT



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 59 821.5

Anmeldetag: 19. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: Siemens Aktiengesellschaft, 80333 München/DE

Bezeichnung: Bio-Chip

IPC: G 01 N, C 12 M

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Beschreibung

Bio-Chip

5 Die Erfindung betrifft einen Bio-Chip, insbesondere DNA-Chip, gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruches.

10 Bio- bzw. DNA-Chips umfassen einen Flachträger, auf dessen einer Seite wenigstens ein Spot-Array, also eine rasterartige Anordnung von Analysepositionen vorhanden ist. Die Spots enthalten auf der Trägeroberfläche immobilisierte Sonden- oder Fängermoleküle, beispielsweise Oligonucleotide. In einer auf einen Spot applizierten Analytlösung enthaltene Zielmoleküle, beispielsweise DNA-Bruchstücke koppeln an die Fängermoleküle an. Die Umwandlung solcher Koppel- bzw. Bindungsereignisse in detektierbare Signale erfolgt mit optischen, piezoelektrischen, elektrochemischen, kalorimetrischen oder impedanzspektroskopischen Methoden.

15 20 Bei einem aus DE 196 10 115 C2 bekannten impedanzspektroskopisch auslesbaren DNA-Chip ist auf einer Sensorfläche eine interdigitale Elektrodenanordnung vorhanden, wobei Fängermoleküle auf den Elektroden und den zwischen den Elektroden angeordneten Flächen immobilisiert sind. Die Ankopplung von Zielmolekülen an die Fängermoleküle führt z.B. aufgrund von Ladungsänderungen zu einer Änderung des von den Elektroden erzeugten elektrischen Wechselfeldes bzw. allgemein zu einer Änderung einer elektrischen Eigenschaft in der Umgebung der Elektroden, z.B. der Impedanz. Eine Messung einer Impedanzänderung lässt mit einer beispielsweise 2-poligen interdigitalen Elektrodenanordnung durchführen, bei der die Elektroden aus mehreren Teilelektroden gebildet sind. Problematisch bei dieser Art der Detektion von Bindungsereignissen ist, dass sich die Abmessungen der Elektrodenstrukturen um Größenordnungen von molekularen Dimensionen unterscheiden. Mit noch vertretbarem technischen Aufwand lassen sich Elektroden herstellen, mit deren Breite und Abstand zusammengenommen einen

Wert L von etwa 2-20 μm und eine Höhe von etwa 0,1 bis 0,5 μm aufweisen.

Der impedanzspektroskopisch erfassbare Bereich des elektrischen Feldes einer solchen Elektrodenanordnung erstreckt sich etwa 1 bis 5 L (= 2 bis 100 μm) über die Trägeroberfläche bzw. die von der Elektrodenanordnung aufgespannte Planebene hinaus. Dagegen hat ein beispielsweise 100 Basenpaare aufweisendes Fängermolekül eine Länge von nur etwa 30 nm. Entsprechend gering ist der Einfluss von Bindungsereignissen in einer auf der Sensorfläche bzw. den Elektroden immobilisierten unimolekularen Schicht von Fängermolekülen auf das elektrische Feld, insbesondere dann, wenn nur wenige Bindungsvorgänge stattfinden. In „Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors“, P. van Gerwen et al, Sensors and Actuators B 49, 1998, 72 – 80 wird zur Lösung des angesprochenen Problems eine Annäherung der Dimensionen von Elektrodenstrukturen an die Dimensionen von DNA-Zielmolekülen vorgeschlagen, wobei Elektrodenstrukturen mit Teilelektroden angestrebt werden, deren Breiten und gegenseitigen Abstände etwa im Bereich von 250 bis 500 nm liegen. Solche Dimensionen sind jedoch mit einem erhöhten Herstellungsaufwand verbunden.

Aufgabe der Erfindung ist es, einen kostengünstig herstellbaren, impedanzspektroskopisch auslesbaren DNA-Chip mit verbesselter Sensitivität vorzuschlagen.

Die Aufgabe ist erfindungsgemäß durch die Merkmale des Patentanspruchs 1 gelöst. Bei der Erfindung ist die Elektrodenanordnung zumindest teilweise in eine für Zielmoleküle durchlässige hydrophile Reaktionsschicht eingebettet, in der immobilisierte Fängermoleküle dreidimensional verteilt sind. Die Reaktionsschicht ist dabei so dimensioniert, dass sie von dem überwiegenden Teil des von der Elektrodenanordnung erzeugten elektrischen Feldes bzw. von deren impedanzspektroskopischen Erfassungsbereich durchdrungen ist. Ein Vorteil eines solchen Biochips ist zunächst, dass innerhalb der Reaktionsschicht

eine wesentlich größere Anzahl von Fängermolekülen angeordnet werden kann als in einer unimolekularen Schicht auf der Trägeroberfläche und auf den Oberflächen der Elektroden. Hinzu kommt aber noch, dass die Abmessung der Reaktionsschicht an den vom elektrischen Feld bzw. von dessen Feldlinien durchdrungenen Raum angepasst ist, so dass eine große Anzahl bzw. eine hohe Konzentration von Fängermolekülen mit etwa homogener Verteilung innerhalb des genannten Erfassungsbereiches vorhanden ist. Die Folge ist eine weitaus größere Beeinflussung des elektrischen Feldes bzw. des impedanzspektroskopischen Erfassungsbereiches der Elektrodenanordnung. Ein derart ausgestalteter DNA-Chip weist eine entsprechend größere Messempfindlichkeit bzw. Sensitivität auf.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung weist die Reaktionsschicht eine Dicke auf, die etwa im Bereich von 1 - 5 L liegt. Dadurch ist gewährleistet, dass einerseits ein Bereich des elektrischen Feldes mit relativ hoher Feldliniendichte zur Detektion von Bindungsereignissen genutzt wird und andererseits die Dicke der Reaktionsschicht nicht so groß ist, dass sie das Eindiffundieren von Zielmolekülen und Reaktanten behindert. Bei Elektrodenbreiten im Bereich von etwa 1 µm und ebensolchen Abständen beträgt die Dicke der Reaktionsschicht vorzugsweise 2 bis 100 µm.

Mit einer bis etwa 95 °C thermisch stabilen Reaktionsschicht ist ein DNA-Chip der in Rede stehenden Art für PCR-Reaktionen anwendbar. Thermisch stabil soll dabei bedeuten, dass die Reaktionsschicht auch bei der genannten Temperatur derart beschaffen ist, dass sie sich nicht auflöst, dass sie Fängermoleküle festhält, dass in ihr Reaktionen zwischen Ziel- und Fängermolekülen ungehindert stattfinden können und dass sie auch ihre sonstigen Eigenschaften im wesentlichen beibehält. Bei einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung enthält die Reaktionsschicht Polymere mit Kopplungsgruppen, an die Fängermoleküle kovalent gebunden sind. Dadurch ist sicher gewährleistet, dass Bindungspaare aus Ziel- und Fängermolekülen bei

Spülvorgängen während des Analysenganges in der Reaktionsschicht zurückgehalten werden. Eine besonders geeignete Reaktionsschicht besteht aus einem Hydrogel. Hydrogele bilden ein wässriges Milieu in mechanisch stabiler Form, das einen

5 Stoffaustausch mit einem überwiegend wässrigen Analyten erlaubt. Als besonders geeignet haben sich radikalisch vernetzbare Hydrogele auf Acrylamidbasis mit Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat als Kopplungsgruppen erwiesen.

10 Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst der Flachträger des DNA-Chips eine Siliziumschicht und eine damit verbundene Isolierschicht, wobei letztere auf ihrer der Siliziumschicht abgewandten Seite die Elektrodenanordnung und die Reaktionsschicht trägt. Bei einer solchen Anordnung lässt sich die elektrische Verschaltung der Elektrodenstruktur mit aus der Si-Halbleitertechnologie bekannten Analog- und Digital-Schaltungen verwirklichen.

15 Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zei-
gen:

20 Fig. 1 eine vereinfachte perspektivische Darstellung eines Flachträger und ein Spot-Array umfassenden Bio-chips,

Fig. 2 einen Querschnitt durch einen Spot entsprechend Linie II-II in Fig. 1, in vergrößerter ausschnittsweiser Darstellung,

30 Fig. 3 einen Ausschnitt einer einem Spot zugeordneten Elektrodenanordnung,

Fig. 4 eine Ausführungsform eines Biochips mit einer 4-poligen Elektrodenanordnung in einer Fig. 2 entsprechenden Darstellung, und

35 Fig. 5 die Elektrodenanordnung des Biochips von Fig. 4 in einer Fig. 3 entsprechenden Darstellung.

Wie Fig. 1 zeigt, umfasst ein Biochip 1 einen Flachträger 2, auf dessen einer Seite ein Spot-Array 3 aufgebracht ist. Ein Spot 4 enthält immobilisierte Fängermoleküle, beispielsweise Oligonucleotide. Wird auf einen Spot eine Analytlösung mit unbekannten Zielmolekülen aufgebracht, so kommt es bei entsprechender Übereinstimmung in der Basensequenz zu einer Ankopplung des Zielmoleküls an das Fängermolekül. Die durch ein solches Bindungsereignis hervorgerufene Eigenschaftsänderung, z.B. Änderungen des spezifischen Widerstandes oder der Di-
10 elektrizitätskonstante, wird mit einer Elektrodenanordnung 5 impedanzspektroskopisch erfasst.

Bei dem Ausführungsbeispiel von Fig. 2 ist eine 2-polige Elektrodenanordnung vorhanden. Diese ist beispielsweise mit Hilfe eines photolithographischen Verfahrens auf den Flachträger 2 aufgebracht. Die Elektrodenanordnung 5 umfasst zwei Elektroden 6, 7, die in Form einer Interdigitalstruktur ausgebildet sind. D.h. jede Elektrode umfasst mehrere streifenförmige parallel zueinander verlaufende Teilelektroden 6a, 7a, die sich jeweils in den Zwischenraum zweier Teilelektroden der jeweils anderen Elektroden hinein erstrecken. Die Teilelektroden 6a, 7a sind durch einen ebenfalls streifenförmigen, sich quer zu den Teilelektroden 6a, 7a streckenden Verbindungsleiter 6b, 7b miteinander verbunden. Die Elektroden 6, 7 sind mit einer Wechselspannung z.B. im Megahertzbereich beaufschlagt. Die Breite 8 der Teilelektroden 6a, 7a beträgt ca. 1 µm, ihre Höhe 9 beträgt etwa 100 bis 500 nm. Zwischen den Teilelektroden 6a, 7a ist ein Abstand 10 von ebenfalls ca. 1 µm vorhanden.
30

Der Flachträger 2 umfasst eine Siliziumschicht 12 und eine zwischen dieser und den Elektroden 6, 7 angeordnete Isolierschicht 13 z.B. aus Siliziumdioxid oder Siliziumnitrid. Die für die impedanzspektroskopische Messung von Bindungsereignissen erforderlichen elektrischen Verschaltungen und Bauteile sind in herkömmlicher Weise durch eine entsprechende Strukturierung der Siliziumschicht (nicht dargestellt) reali-
35

siert. Auf der Isolierschicht 13 ist eine Reaktionsschicht 14 aus einem Hydrogel aufgebracht, welches weiter unten näher beschrieben wird.

5 In der Reaktionsschicht 14 bzw. dem Hydrogel sind Fänger moleküle 15, die in Fig. 2 überdimensioniert und symbolisch dargestellt sind, eingebettet und homogen verteilt. Ein Fänger molekül mit 300 Basen weist etwa eine Länge von 100 nm auf. Demzufolge hat eine unimolekulare Schicht von Fänger molekülen 10 bei herkömmlichen Biochips allenfalls etwa eine Dicke entsprechend der Linie 16 in Fig. 2. Es ist leicht einsehbar, dass eine solche Schicht relativ wenige Fänger moleküle 15 aufnehmen und dementsprechend im Falle von Bindungsereignissen das elektrische Feld nur gering beeinflussen kann. Demgegenüber ist bei einem erfindungsgemäßen Biochip der Fänger moleküle enthaltende und von Feldlinien durchdrungene Reaktionsbereich wesentlich erweitert und bietet Platz für eine um mehrere Zehnerpotenzen größere Anzahl von Zielmolekülen 15. Wird auf 15 ein solcher Art ausgestaltete Spot-Arrays 3 bzw. auf einen Spot 4 eine Analytlösung 18 aufgebracht, so finden die darin enthaltenen Zielmoleküle 19, was in Fig. 2 ebenfalls übertrieben groß und nur symbolisch dargestellt ist, eine wesentlich größere Anzahl möglicher Bindungspartner in Form der Fänger moleküle 15 vor. Die Reaktionsschicht 14 ist vorzugsweise so dimensioniert, bzw. weist eine derartige Dicke auf, dass der impedanzspektroskopische Erfassungsbereich praktisch vollständig ausgenutzt ist, was bei einer Dicke der Reaktionsschicht von etwa 2 bis 100 µm der Fall ist. Bei entsprechender Konzentration von Fänger molekülen 15 in diesem Bereich kann somit der bindungsspezifische Messeffekt des Biochips 20 wesentlich erhöht werden.

Die Reaktionsschicht 14 ist so beschaffen, dass sie ein wässriges Reaktionsmedium zur Verfügung stellt. Weiterhin ist sie 25 so beschaffen, dass Zielmoleküle 19 oder auch andere für eine Reaktion benötigte Stoffe, beispielsweise Polymerase, in sie

eindiffundieren können, ohne das dabei ihre Aktivität beeinträchtigt wird.

Wie schon oben erwähnt, wird erfindungsgemäß ein Hydrogel als
5 Reaktionsschicht 14 verwendet. Ein Hydrogel stellt ein wässriges Milieu in mechanisch stabiler Form bei gleichzeitiger Gewährleistung des Stoffaustausches in einer überwiegend
10 wässrigen Umgebung dar. Durch Wahl der chemischen Zusammensetzung, was die Komponenten und deren Verhältnis untereinander betrifft, können die Eigenschaften der Hydrogele, wie Wassergehalt, Quellverhalten, mechanische Stabilität, etc.
über weite Bereiche variiert werden.

Ein Hydrogel, das leicht herstellbar ist, und das eine gute
15 Haftung sowohl zur Elektrodenanordnung 5 als auch zur Isolienschicht 13 aufweist, ist ein radikalisch vernetzbares Hydrogel auf Acrylamidbasis, das ein Comonomer enthält, welches eine kovalente Ankopplung entsprechend modifizierter Fängermoleküle über Linkergruppen ermöglicht. Das Hydrogel
20 umfasst neben der Monomervorstufe des Polyacrylamids ein Vernetzungsmittel, wenigstens einen Radikalinitiator, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls wenigstens einen Weichmacher. Nach Schichtherstellung und anschließender thermischer bzw. Fotovernetzung wird ein mit Wasser quellbares Hydrogel erhalten, dass reaktive Linkergruppen zur Immobilisierung von Fängermolekülen enthält. Als Vernetzungsmittel werden Methylenbisacrylamid und/oder Dimethylacrylsäureester, beispielsweise Tetraethylenglykoldimethacrylat eingesetzt.

30 Durch eine Variation der Konzentrationen des Vernetzungsmittels lässt sich die Maschenweite des Hydrogels einstellen. Das verwendete Comonomer enthält Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat. Als Weichmacher eignet sich Mono-Di-
35 und/oder Triethylenglykol. Die genannten Ausgangsstoffe sind mit einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, vorzugsweise mit Dimethylformamid vermengt.

Durch die Variation des Lösungsmittelsanteiles kann die Verarbeitungsviskosität eingestellt werden. Die Haftung an der Flachträgeroberfläche sowie an der Elektrodenanordnung 5 kann 5 durch Beimengung üblicher Haftvermittler beispielsweise auf Silanbasis verstärkt werden.

In Fig. 4 und 5 ist ein Ausführungsbeispiel mit einer 4-polaren Elektrodenanordnung 20 dargestellt. Die Elektrodenanordnung 20 setzt sich aus zwei Stromelektroden 22, 23 und 10 zwei Spannungs- bzw. Sondenelektroden 24, 25 zusammen. Die Stromelektroden 22, 23 sind entsprechend der Elektrodenanordnung 5 des Ausführungsbeispiels nach Fig. 2 angeordnet und 15 ausgestaltet. Die Sondenelektroden 24, 25 sind ebenfalls streifenförmig und erstrecken sich als mäanderförmiger Doppelstrang durch die zwischen den Teilelektroden 22a und 23a vorhandenen Zwischenräume hindurch. Die Stromelektroden 22, 23 sind mit einem hochfrequenten Wechselstrom beaufschlagt. An den Sondenelektroden 24, 25 liegt ein Spannungsmesser 26 20 an, mit dem eine Veränderung des elektrischen Wechselfeldes in Folge von Bindungssereignissen detektierbar ist.

Die Messung kann somit unabhängig von den Stromelektroden erfolgen, so dass sich z.B. deren die Elektrodenimpedanz erhöhende Polarisation nicht auf die Messung auswirken kann. Da-gegen muss bei einer 2-poligen Elektrodenanordnung die Elektrodenimpedanz durch eine entsprechend hohe, messtechnisch ungünstige Messfrequenz gering gehalten werden, um den für 30 die Messung ausschlaggebenden Widerstand der Analytlösung bzw. der Reaktionsschicht bestimmen zu können.

Patentansprüche

1. DNA-Chip mit einem Flachträger (2) und einem darauf angeordneten Array (3) von Fänger molekülen enthaltenden Spots (4),

5 wobei jedem Spot (4) eine Mikroelektroden-Anordnung (5) zur Detektion von Bindungsereignissen zwischen den Fänger molekülen und mittels einer Analytlösung applizierten Zielmolekülen zugeordnet ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrodenanordnung (5) zumindest teilweise in eine für 10 Zielmoleküle durchlässige hydrophile Reaktionsschicht (14) eingebettet ist, in der immobilisierte Fänger moleküle dreidimensional verteilt sind.

15 2. DNA-Chip nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht eine Dicke aufweist, die etwa im Bereich von 1 bis 5 L liegt, wobei L die Summe aus Elektrodenbreite und Elektrodenabstand ist.

20 3. DNA-Chip nach Anspruch 2, gekennzeichnet durch eine Dicke der Reaktionsschicht (14) von 2 bis 100 µm.

4. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht (14) bis etwa 95 °C thermisch stabil ist.

30 5. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht (14) Kopp- lungengruppen zur kovalenten Bindung von Fänger molekülen ent- hält.

6. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht (14) ein Hydrogel ist.

35

7. DNA-Chip nach Anspruch 7, gekennzeichnet durch ein radikalisch vernetzbares Hydrogel auf Acrylamid-

basis mit Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat als Kopplungsgruppen.

8. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gekennzeichnet durch eine interdigitale Elektrodenanordnung (5).

9. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Flachträger (2) eine Halbleiterschicht und eine damit verbundene Isolierschicht (13) umfasst, wobei letztere auf ihrer der Halbleiterschicht abgewandten Seite die Elektrodenanordnung (5) und die Reaktionsschicht (14) trägt.

10. DNA-Chip nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Halbleiterschicht eine Siliziumschicht (12) ist.

Zusammenfassung**Bio-Chip**

5 Die Erfindung betrifft einen Bio-Chip mit einem Flachträger und einem darauf angeordneten Array von Fängermolekülen enthaltenden Spots, wobei jedem Spot eine Mikroelektrodenanordnung zur impedanzspektroskopischen Detektion von Bindungseignissen zwischen den Fängermolekülen und mittels einer Analytlösung applizierten Zielmolekülen zugeordnet ist.

10 Zur Erhöhung der Sensitivität bzw. des bindungsspezifischen Messeffekts des Bio-Chips ist die Elektrodenanordnung zumindest teilweise in eine Fängermoleküle enthaltende und für Zielmoleküle durchlässige hydrophile Reaktionsschicht eingebettet.

15

FIG 2

FIG 1

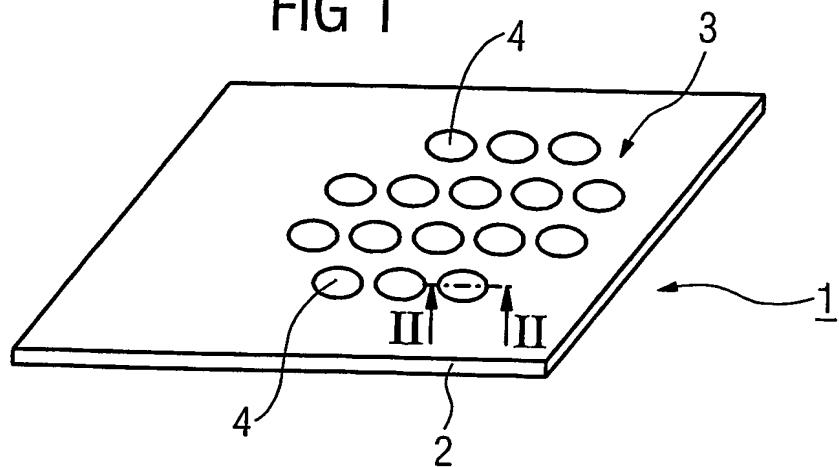


FIG 2

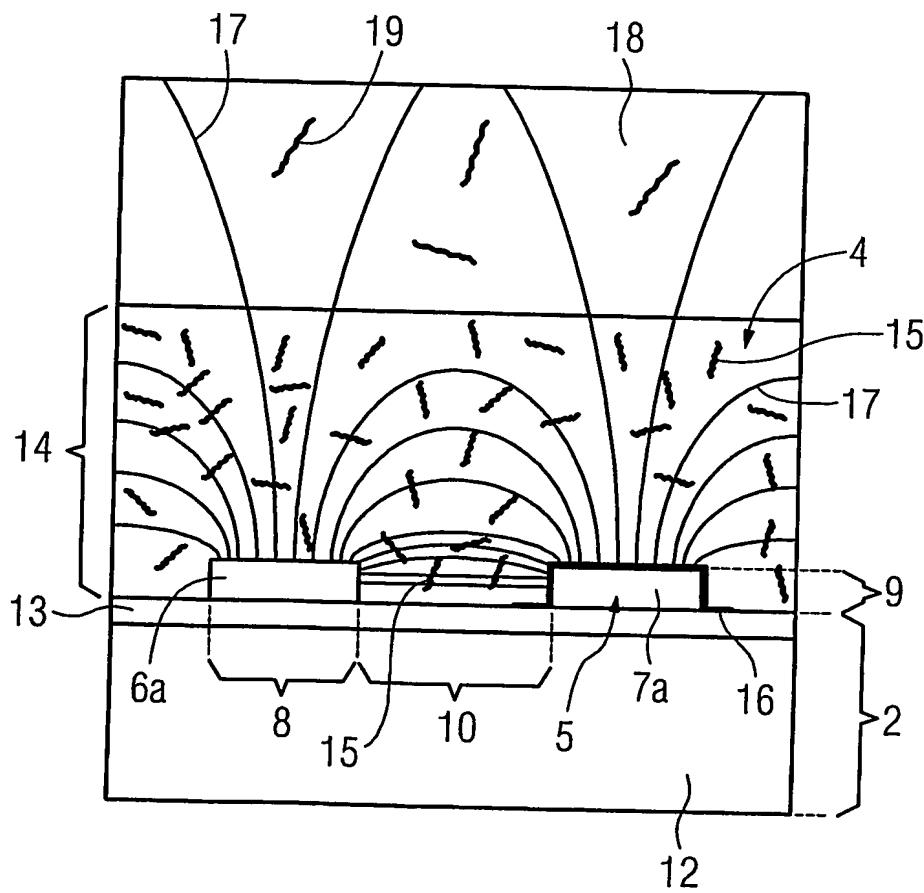


FIG 3

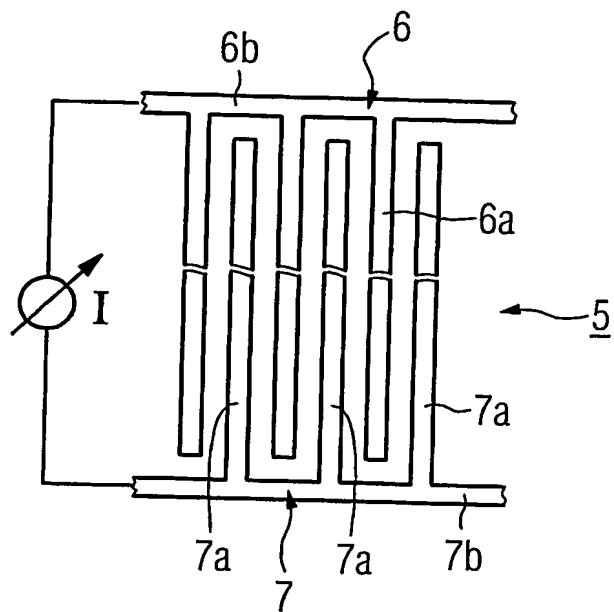


FIG 4

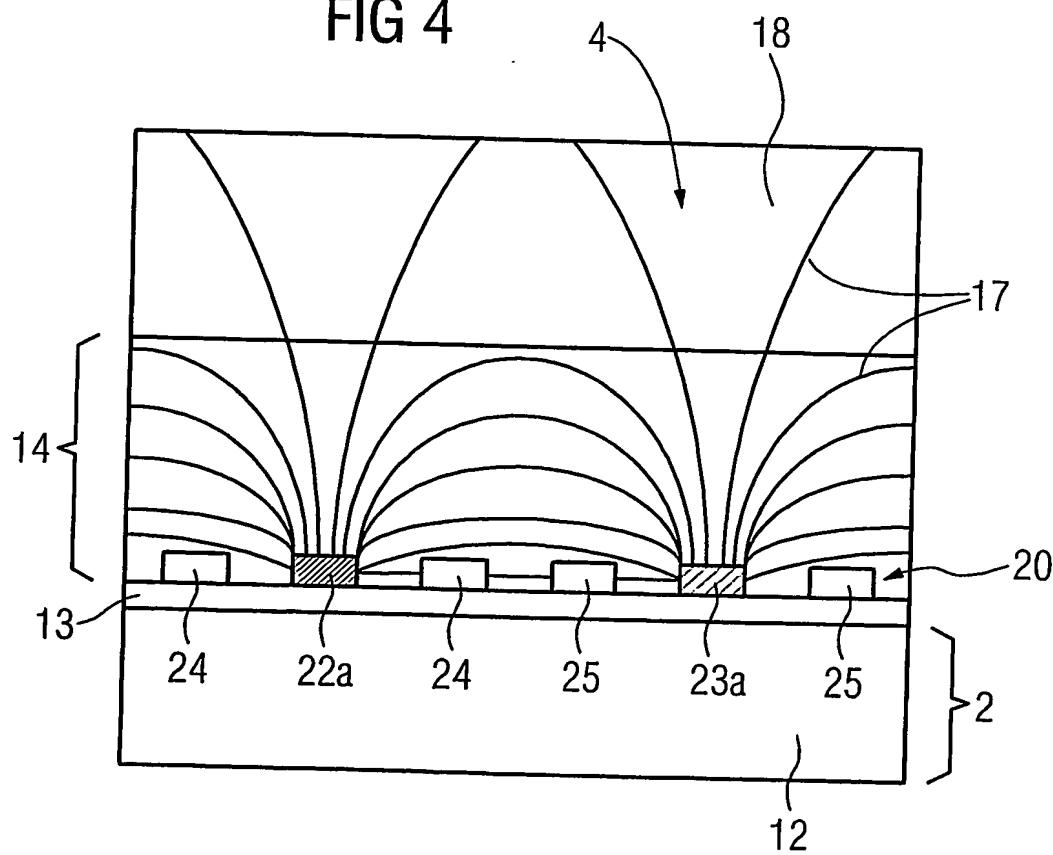


FIG 5

